

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

09/644-456 10/14/03
(11) N° de publication :

2 411 828

(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

C07K7/18

A1

DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION

(21)

N° 78 35071

(54) Analogue cyclique de la bradykinine, constitué par la cyclo- [(N^ε-L-L lysine, 6-glycine)-bradykinine].

(51) Classification internationale (Int. Cl.²). C 07 C 103/52//A 61 K 37/42.

(22) Date de dépôt 13 décembre 1978, à 15 h 19 mn.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : *Demande de certificat d'auteur déposée en U.R.S.S. le 14 décembre 1977, n. 2.555.261 au nom du demandeur.*

200
(41) Date de la mise à la disposition du public de la demande B.O.P.I. — «Listes» n. 28 du 13-7-1979.

(71) Déposant : INSTITUT ORGANICHESKOGO SINTEZA AKADEMII NAUK
LATVIISKOI SSR, résidant en U.R.S.S.

(72) Invention de : G.I. Chipens, F.K. Mutulis et I.P. Misinya.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Z. Weinstein.

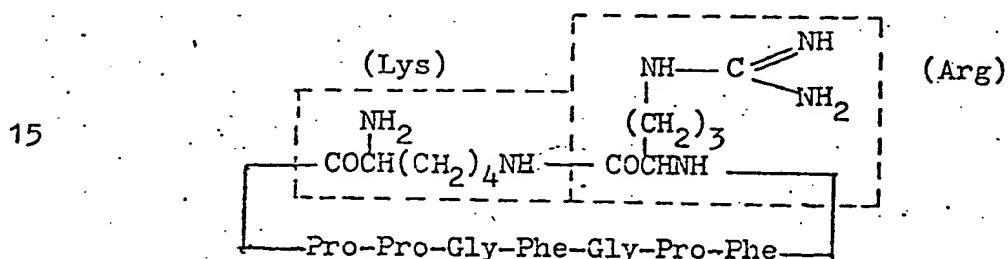
La présente invention concerne la chimie organique et a notamment pour objet de nouveaux analogues synthétiques de l'hormone tissulaire naturelle appelée bradykinine.

5 La bradykinine et d'autres peptides contenant une suite d'acides-amino de la bradykinine, par exemple la kallidine, la méthionyl-lysyl-bradykinine, les kinines des poisons d'animaux et d'insectes, sont largement répandus dans la matière organique et exercent des fonctions importantes de régulations des processus biochimiques et physiologiques dans l'organisme des animaux et de l'homme. Les perturbations du mécanisme de formation et de décomposition de la bradykinine et des peptides qui lui sont apparentés provoquent diverses affections et divers états pathologiques de l'organisme humain. C'est pourquoi il existe un besoin urgent en analogues et antimétabolites de la bradykinine, capables d'exercer l'influence nécessaire sur ces processus. (T.S. Paskhina. "Bases biochimiques de la pathologie du système cardiovasculaire". Dans le recueil "Bases moléculaires de la pathologie". M., "Médictsina", 1966, 123-178. A.A. Dzizinsky, O.A. Gomazkov. 20 "Les kinines dans la physiologie et la pathologie du système cardiovasculaire", Novosibirsk, 1976).

La bradykinine naturelle elle-même ne peut être utilisée à cet effet. Parmi ses principaux inconvénients il convient de citer sa courte durée d'action (la période de demi-vie de la bradykinine dans le sang humain est de 30 secondes 25 (K.A. Saameli, T.K. Eskes. "Am.J. Physiol." 203, 261, 1962) et son spectre étendu d'effets biologiques, c'est-à-dire l'absence de sélectivité. Ainsi, la bradykinine en tant qu'hormone exerce un effet sur la musculature lisse, le système circulatoire, influe sur la perméabilité des vaisseaux capillaires, et exerce beaucoup d'autres effets. C'est pourquoi l'usage thérapeutique de la bradykinine peut conduire à des phénomènes secondaires inadmissibles. Il en va de même des analogues synthétiques de la bradykinine, dont le nombre dépasse 170 35 ("Handbook of Experimental Pharmacology", vol. XXV. "Bradykinin, Kallidin and Kallikrein". Ed. E.G. Erdos. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, 1970, 1-768). Parmi eux on n'a pas pu trouver de composés doués d'une sélectivité prononcée et exerçant un effet biologique prolongé.

La présente invention permet d'éviter les inconvénients précités.

L'invention a donc pour objet un analogue cyclique de la bradykinine, la cyclo- [(N^ε-L-lysine, 6-glycine)-bradykinine], dans laquelle l'arginine N terminale de la bradykinine est remplacé par la L-lysine, la sérine en position 6 de la bradykinine est remplacée par la glycine, le cycle est fermé par liaison peptidique formée entre le groupe carbonyle de l'arginine et le groupe ε-amino de la lysine, ledit analogue cyclique répondant à la formule :



20 dans laquelle Lys est le résidu de L-Lysine, Pro est le résidu de L-proline, Gly est le résidu de glycine, Phe est le résidu de L-phénylalanine, Arg est le résidu de L-arginine.

Le composé faisant l'objet de l'invention (désigné dans la suite de la présente description par "ACB") est remarquable par son excellente sélectivité d'action et sa période de demi-vie très prolongée, c'est-à-dire qu'il est doué de propriétés d'une grande valeur du point de vue thérapeutique.

Au cours de tests d'abaissement de la pression sanguine chez les rats, l'ACB (endose de 50 µg/kg) a manifesté une activité approximativement égale à l'activité de la bradykinine, mais, tandis que l'effet biologique de la bradykinine disparaissait déjà complètement 1,5 minute après l'administration de l'hormone, une administration unique d'ACB entraînait un abaissement stable de la pression sanguine pendant trois heures. En même temps, l'ACB n'a pas manifesté l'activité myotrope qui caractérise les kinines (test de contraction de l'iléon du rat), manifestant ainsi sa sélectivité d'effet prononcée.

On obtient le composé, objet de l'invention, répondant à la formule précitée, par un procédé comprenant, selon

l'invention, les étapes suivantes :

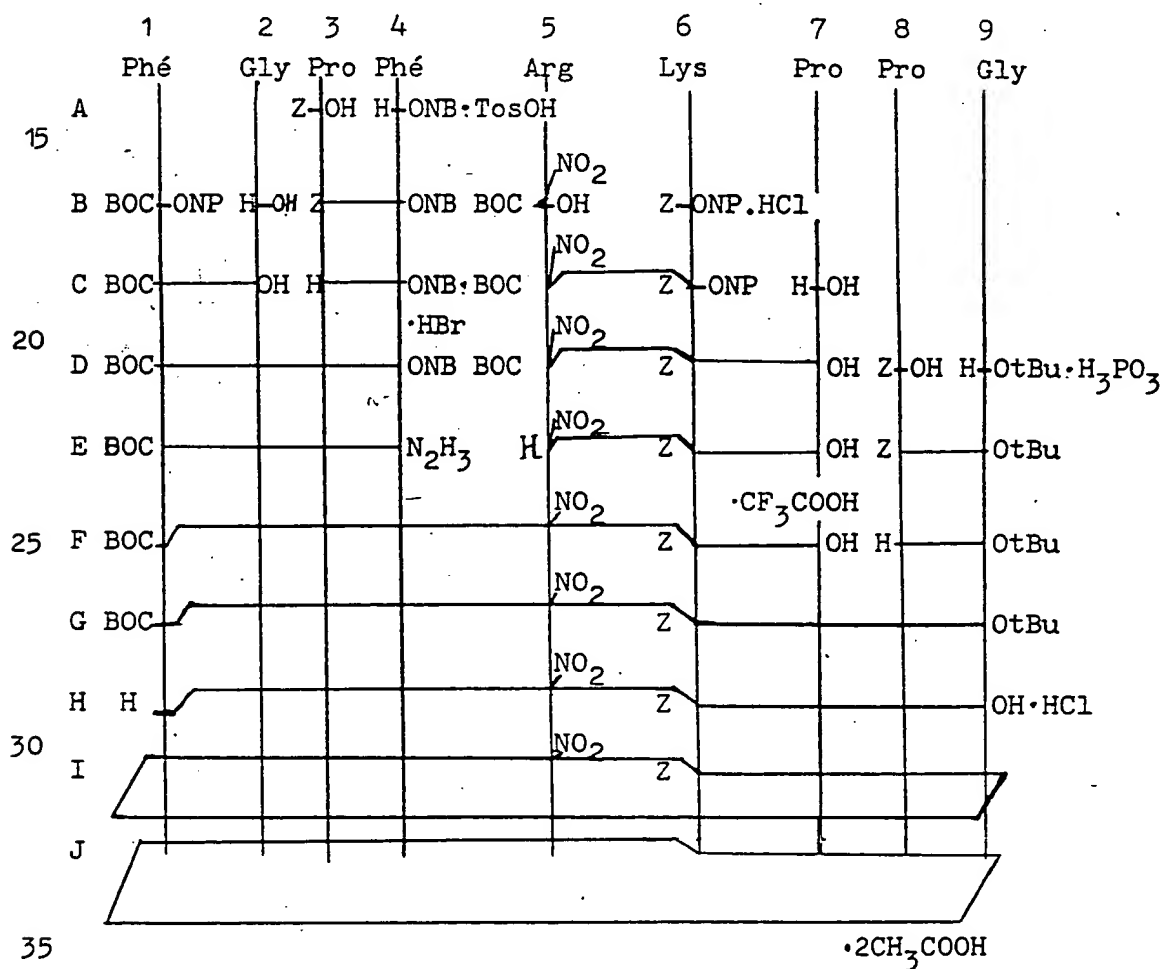
- a) réaction de benzyloxycarbonyl-proline sur l'éther tert-butylique de glycine, avec obtention d'éther tert-butylique de benzyloxycarbonyl-prolyl-glycine ;
- 5 b) hydrogénation du produit de l'étape (a), avec obtention d'éther tert-butylique de prolyl-glycine ;
- c) réaction de tert-butoxycarbonyl-nitro-arginine sur l'éther p-nitrophénilique de α -benzyloxycarbonyl-lysine, avec obtention d'éther p-nitrophénilique de α -benzyloxy-
- 10 carbonyl ϵ -tert-butoxycarbonyl-nitro-arginyl-lysine ;
- d) réaction du produit de l'étape (c) sur la proline, avec obtention de α -benzyloxycarbonyl, ϵ -(tert-butoxycarbonyl-nitro-arginyl)lysyl-proline ;
- e) traitement du produit de l'étape (d) par l'acide
- 15 trifluoro-acétique, avec obtention de trifluoro-acétate de α -benzyloxycarbonyl, ϵ -(nitro-arginyl)lysyl-proline ;
- f) réaction d'éther p-nitrophénilique de tert-butoxycarbonyl-phénylalanine sur la glycine, avec obtention de tert-butoxycarbonyl-phénylalananyl-glycine ;
- 20 g) réaction du produit de l'étape (f) sur l'éther p-nitrobenzylique de prolyl-phénylalanine, avec obtention d'éther p-nitrobenzylique de tert-butoxycarbonyl-phénylalananyl-glycyl-prolyl-phénylalanine ;
- h) traitement du produit de l'étape (g) par l'hydrate
- 25 d'hydrazine, avec obtention d'hydrazide de tert-butoxycarbonyl-phénylalananyl-glycyl-prolyl-phénylalanine ;
- i) réaction des produits des étapes (e) et (h), avec obtention de α -benzyloxycarbonyl, ϵ -(tert-butoxycarbonyl-phénylalananyl-glycyl-prolyl-phénylalananyl-nitro-arginyl)lysyl-
- 30 proline ;
- j) réaction des produits des étapes (b) et (i), avec obtention d'éther tert-butylique de α -benzyloxycarbonyl, ϵ -(tert-butoxycarbonyl-phénylalananyl-glycyl-prolyl-phénylalananyl-nitro-arginyl)-lysyl-prolyl-glycine ;
- 35 k) transformation du produit de l'étape (j) en hydrochlorure de α -benzyloxycarbonyl, ϵ -(phénylalananyl-glycyl-prolyl-phénylalananyl-nitro-arginyl)lysyl-prolyl-prolyl-glycine ;
- l) cyclisation du produit de l'étape (k), avec obtention d cyclo- α -benzyloxycarbonyl, ϵ -(phénylalananyl-glycyl-

prolyl-phénylalaninyl-nitro-arginyl)lysyl-prolyl-prolyl-glycyl];

m) hydrogénation du produit de l'étape (1) avec obtention de cyclo-[$(N^{\epsilon}$ -1-L-lysine, 6-glycine)bradykinine].

Pour une meilleure compréhension de l'invention, des exemples non limitatifs d'obtention de composés conformes à l'invention sont décrits dans ce qui suit, accompagnés d'un schéma de synthèse desdits composés, ainsi que des résultats des essais biologiques auxquels ils ont été soumis.

10 Synthèse de l'analogue cyclique de la bradykinine, objet de l'invention.



Tous les amino-acides, sauf la glycine, ont une configuration en L. Les températures de fusion déterminées dans des capillaires ouverts sont indiquées sans corrections. L'individualité des composés obtenus a été vérifiée par chromatographie sur couches minces, sur des plaques "Silufol" UV 254, dans les systèmes : A - chloroforme-éthanol-éthylacétate-acide acétique-eau (85:5:8:2:0,25) ; B-chloroforme-éthanol-n-butanol-éthylacétate-eau (10:6:4:3:1) ; C - chloroforme-méthanol-eau (40:30:5) ; D-butanol-acide acétique-eau (4:1:1) ; E-éthylacétate-pyridine-acide acétique-eau (5:5:1:3), ainsi que par électrophorèse sur papier FN 16 dans l'acide acétique 1N ou 5N. La mobilité électrophorétique E_{HIS} a été vérifiée relativement à l'histidine. Les taches de substances ont été détectées par examen de chromatogrammes à la lumière ultraviolette, ainsi que par pulvérisation d'hydrate de tricéto-hydrindène connu sous la dénomination commerciale "Ninhydrine", ou à l'aide de chlore (réactif de la benzidine). Pour tous les composés, les données de l'analyse élémentaire ont correspondu d'une manière satisfaisante aux teneurs calculées en C, N, H. Pour identifier les composés on a utilisé largement la résonance magnétique protonique à 60 MHz. Les déplacements chimiques, la forme et l'intensité des signaux ont été conformes à la constitution des peptides. L'analyse des amino-acides a été faite après l'hydrolyse du peptide dans une ampoule soudée, à la température de 110° pendant 24 h.

a) Ether tert-butylique de benzyloxycarbonyl-prolylglycine (E-8-9).

On a dissout 10,0 g (40 millimoles mM) de benzyloxycarbonylproline dans 50 ml de diméthylformamide, on y a ajouté 4,45 ml (40 mM) de N-méthylmorpholine et, par gouttes, une solution refroidie à -45°C de 5,30 ml (40mM) de chloro-carbonate d'isobutyle dans 10 ml de diméthylformamide. Ensuite, on a agité le mélange réactionnel pendant encore 30 minutes à la température de -15°C, et on y a ajouté une suspension refroidie de 10,6 g (50mM) de phosphite d'ether tert-butylique de glycine dans 100 ml de diméthylformamide et 0,56 ml (50mM) de N-méthylmorpholine. On a agité pendant 30 minutes à la température de -15°C, puis on a laissé reposer le récipient de réaction à la température de -10°C

pendant 15 heures. Le solvant a été soumis à une évaporation dans le vide, le résidu a été dissout dans un mélange de 100 ml d'éthylacétate et de 100 ml d'eau, la couche d'éthylacétate a été lavée avec des solutions à 10% de bicarbonate de potassium et de bisulfate de potassium et avec de l'eau, on a séché au-dessus de sulfate de magnésium, on a filtré et on a effectué une concentration par évaporation. L'huile obtenue a été cristallisée par traitement par un mélange d'éther et d'hexane (1:1). Rendement : 9,2 g (63%). Température de fusion 71-72°C ; $[\alpha]_D^{20} = -49,0^\circ$ (c=2, au diméthylformamide). $R_f = 0,55$ (A) : 0,64 (B) : 0,68 (C).

b) Ether tert-tubylque de prolyl-glycine (F 8-9)
On a hydrogéné 5,0 g (13,8 mM) de E 8-9 dans une solution de 50 ml d'éthanol en présence de noir de palladium durant 5 heures. Après filtrage du catalyseur on a soumis le solvant à une évaporation, le résidu a été dissout dans un mélange d'éther sec et d'hexane (1:2) et on a effectué de nouveau une concentration par évaporation entraînant une cristallisation. Après évaporation complète on a obtenu une matière cristalline incolore. Rendement : 2,8 g (89%). Température de fusion 56-57°C $[\alpha]_D^{20} = 38,6^\circ$ (c=1, diméthylformamide) $E_{HIS} = 0,83$ (acide acétique 1N). $R_f = 0,28$ (C) ; 0,15 (D) : 0,70 (E).

c) Ether p-nitrophénylique de α -benzyloxycarbonyl-t-(tert-butoxycarbonyl-(W-nitro)arginyle)-lysine (C 5-6). A une solution de 12,8 g (34,3 mM) de tert-butoxycarbonyl-(W-nitro)-arginine et de 3,80 ml (34,3 mM) de N-méthylmorpholine dans 100 ml de diméthylformamide à la température de -15°C, on a ajouté 4,63 ml (34,3 mM) de chlorocarbonate d'isobutyle, puis on a introduit 10,0 g (22,8 mM) de poudre de chlorure d'éther p-nitrophénilique de α -benzyloxycarbonyl-lysine. On a agité pendant 30 minutes à la température de -10°C, puis on a ajouté pendant 2 heures, par gouttes, une solution de 2,55 ml (22,8 mM) de N-méthylmorpholine dans 50 ml de diméthylformamide. On a agité pendant encore 30 minutes à la température de -20°C et on a ajouté ensuite 1,33 ml (12,1 mM) de β -diméthylamino-éthylamine. On a agité pendant encore 30 minutes, puis le solvant a été soumis à l'évaporation et le résidu a été dissout dans un mélange de 100 ml d'éthylacétate et de 100 ml d'eau. La couche d'éthylacétate a été

lavée avec des solutions à 10% de bicarbonate de potassium et de bisulfate de potassium (deux fois) et avec de l'eau. On a séché au-dessus de sulfate de magnésium, on a filtré et on a effectué une concentration par évaporation. On a obtenu une matière amorphe jaunâtre. Rendement : 13,5 g (86,5%). $R_f = 0,80$ (A) ; 0,90 (D). $[\alpha]_D^{20} = -20,9^\circ$ (c=1, diméthylformamide).

d) α -benzyloxycarbonyl- ξ -(tert-butyloxycarbonyl ω -nitro)arginyl)-lysylproline (D 5-7). On a dissout 10,0 g (14,2 mM) de C 5-6 dans 100 ml de diméthylformamide, on a introduit 2,46 g (21,4 mM) de proline finement triturée et 1,66 ml (1,49 mM) de N-méthylmorpholine et on a agité sur un agitateur magnétique durant 20 heures. On a soumis alors le solvant à une évaporation et on a dissout le résidu dans un mélange de 100 ml d'éthylacétate et 100 ml d'une solution à 10% de bisulfate de potassium, la couche aqueuse a été séparée et la couche d'éthylacétate a été extraite avec une solution à 10% de bisulfate de potassium et puis avec une solution à 10% de bicarbonate de potassium. La couche eau-bicarbonate a été séparée, neutralisée par un excès de solution à 10% de bisulfate de potassium jusqu'à pH=2 et extraite par l'éthylacétate (2x100 ml). L'extraît a été séché à l'aide de sulfate de magnésium, puis il a été filtré et soumis à évaporation. On a obtenu une matière amorphe incolore. Rendement : 7,9 g (82,0%). $[\alpha]_D^{20} = -23,1^\circ$ (c=1, diméthylformamide). $R_f = 0,54$ (A) ; 0,81 (D).

e) Trifluoro-acétate de α -benzyloxycarbonyl- ϵ -(ω -nitro)-arginyl)-lysylproline (E 5-7). Sous refroidissement à 0°C, on a dissout 5,0 g (7,37 mM) de D 5-7 dans un mélange d'acide trifluoro-acétique et de chlorure de méthylène (1:1). On a maintenu la solution à la température ambiante pendant 20 minutes, puis on a effectué à la température ambiante une concentration par évaporation jusqu'à l'état sec. Le résidu a été trituré avec de l'éther sec et la matière solide formée a été filtrée et lavée sur filtre avec de l'éther sec. Rendement en matière amorphe incolore : 5,0 g (98%). $E_{HIS}=0,49$ (acide acétique 5N), $[\alpha]_D^{20} = -11,1^\circ$ (c=1, diméthylformamide). $R_f=0,57$ (C) ; 0,70 (E).

f) Tert-butoxycarbonyl-phénylalananyl-glycine (C 1-2).

On a dissout 6,4 g (16,6mM) d'éther p-nitrophénylique de tert-butoxycarbonyl-phénylalanine, 1,13 g (15 mM) de glycine et 1,67 ml (15 mM) de N-méthylmorphine dans un mélange de 200 ml de diméthylformamide et de 20 ml d'eau. La solution obtenue a été maintenue pendant 20 heures à la température ambiante, puis on l'a soumise à une concentration par évaporation et l'huile obtenue a été dissoute dans un mélange de 80 ml d'une solution aqueuse à 10% de bicarbonate de potassium et de 50 ml d'éthylacétate. La couche d'éthylacétate a été séparée et la couche aqueuse a été extraite à l'éther (50 ml) et neutralisée avec un excès de solution aqueuse à 10% de bisulfate de potassium (jusqu'à pH = 2). La solution obtenue a été soumise à extraction à l'éthylacétate (2x50 ml), l'extract a été lavé avec de l'eau (50 ml), puis a été séché au-dessus de sulfate de magnésium anhydrique, filtré et soumis à une concentration par évaporation jusqu'à l'état sec. On a obtenu une matière cristalline incolore. Rendement : 4,0 g (82,7%). Pour effectuer l'analyse, la cristallisation a été effectuée à partir d'éthylacétate. Température de fusion 165°C (avec décomposition), $[\alpha]_D^{20} = -9,0^\circ$ (c=1, diméthylformamide) $R_f = 0,85$ (A) ; 0,90 (B) ; 0,88 (C).

g) Ether p-nitrobenzylique de tert-butoxycarbonyl-phénylalananyl-glycyl-prolyl-phénylalanine (D 1-4). On a dissout 2,80 g (8,7 mM) de C 1-2 dans 50 ml de diméthylformamide sec, on y a ajouté 1,84 g (10 mM) de pentafluorophénol, puis on a refroidi jusqu'à la température de -20°C, on a introduit 1,90g (9,2 mM) de dicyclohexylcarbodiimide, on a secoué jusqu'à dissolution de celui-ci, puis on a maintenu la solution pendant 30 minutes à la température de 0°C. On a ajouté ensuite 4,15 g (8,7 mM) d'hydrobromure d'éther p-nitrobenzylique de prolyl-phénylalanine (C 3-4) (A.P.Pavar, G.I.Tchipens. "Z.O.Ch." 41,459, 1971) et 0,97 ml (8,7 mM) de N-méthylmorpholine, On a maintenu à la température ambiante tout en contrôlant le pH du milieu (par application de gouttes de solution sur du papier indicateur humide), et au fur et à mesure de la réaction on a ajouté de la N-méthylmorpholine goutte à goutte pour maintenir le pH à 8. Trois heures après l'introduction du composant amine, le mélange a été soumis à une concentration

par évaporation et on a ajouté au résidu 100 ml de chlorure de méthylène, puis on a filtré et on a lavé le filtrat successivement avec des solutions à 10% de bicarbonate de potassium, de bisulfate de potassium et de l'eau. On a séché au-dessus de sulfate de magnésium anhydre, on a filtré et on a effectué une concentration par évaporation. L'huile obtenue a été cristallisée par détrempe avec de l'éther sec. Rendement : 5,4 g (88,4%). Température de fusion 125 à 155°C. $[\alpha]_D^{20} = -45,6^\circ$ (c=1, diméthylformamide) $R_f = 0,88$ (A) ; 0,91 (B) ; 0,91 (D).

h) Hydrazide de tert-butoxycarbonyl-phénylalanine-glycyl-prolyl-phénylalanine (E 1-4). On a chauffé 3,0 g (4,26 mM) de D-1-4 et 1,0 ml d'hydrate d'hydrazine durant 1 heure dans 30 ml d'éthanol à la température de 70°C. Puis on a filtré, on a ajouté au filtrat 50 ml d'eau, on a maintenu cette solution à la température de -10°C pendant 20 heures, puis on a filtré, on a lavé les cristaux sur filtre avec 30 ml d'une solution aqueuse à 50% d'éthanol et puis de l'eau jusqu'à réaction neutre du filtrat. Le séchage a été effectué dans un exsiccateur au-dessus de P_2O_5 . Rendement 2,30 g (92,8%). Température de fusion 140 à 160°C. $[\alpha]_D^{20} = -59,8^\circ$ (c=1, diméthylformamide). $R_f = 0,93$ (A) ; 0,92 (B) ; 0,91 (D).

i) α -benzyloxycarbonyl-L-(tert-butoxycarbonyl-phénylalaninyl-glycyl-prolyl-phénylalaninyl-(ω -nitro)arginyl)-lysyl-proline (F 1-7). On a dissout 2,1 g (3,62 mM) de E 1-4 dans 50 ml de diméthylformamide, on a refroidi cette solution jusqu'à la température de -30°C et, tout en agitant, on a ajouté un mélange refroidi (à -70°C) de 3,5 ml (15,7 mM) d'une solution 4,5 N d'acide chlorhydrique sec ou analogue dans du tétrahydrofuran et de 20 ml d'éthylacétate. Puis, à la température de -30°C, on a ajouté par gouttes une solution refroidie de 0,45 ml (3,87 mM) de tert-butylnitrite dans 10 ml d'éthylacétate. On a maintenu la solution à la température de -25°C pendant 30 minutes, ensuite on a ajouté 1,76 ml (15,8 mM) de N-méthylmorpholine, puis on a ajouté encore une solution de 2,68 g (3,87 mM) de E 5-7 et de 0,44 ml de N-méthylmorpholine dans 50 ml de diméthylformamide. Pendant 3 jours on a maintenu la solution à la température de -10°C, puis on l'a soumise à une concentration par évaporation et on a dissout le résidu dans un mélange de 100 ml de chlorure de méthylène et de 100 ml d'eau. La couche

de chlorure de méthylène a été séparée, lavée successivement avec des solutions avec des solutions à 10% de bicarbonate de potassium, de bisulfate de potassium et avec de l'eau (100 ml de chaque), on a séché au-dessus de sulfate de magnésium anhydre, puis on a filtré et on a soumis le filtrat à une concentration par évaporation. L'huile obtenue s'est cristallisée par détrempeage avec un mélange d'éther et d'éthylacétate (1:1). Rendement : 3,50 g (85,8%). Température de fusion 140 à 177°C. $[\alpha]_D^{20} = -44,1^\circ$ (c=1, diméthylformamide). $R_f=0,53$ (A) ; 0,84 (B) ; 0,87 (D).

j) Ether tert-butylique de α -benzyloxycarbonyl- ϵ -(tert-butoxycarbonyl-phénylalanyl-glycyl-prolyl-phénylalanyl-(ω -nitro)arginyl)-lysyl-prolyl-prolyl-glycine (G 1-9). On a dissout 2,70 g (2,40 mM) de F 1-7 dans 40 ml de diméthylformamide, on a refroidi cette solution jusqu'à 0°C et on y a ajouté 2,19 g (2,89 mM) de complexe de dicyclohexyl-carbodiimide et de pentafluorophénol ("Complexe F") (J.Kovacs et al. "J.Am. Chem.Soc.", 89,183, 1967) et 1,1 g (4,8 mM) d'éther tert-butylique de prolyl-glycine (F 8-9). Après avoir maintenu la solution à la température ambiante pendant 20 heures, on l'a soumise à une évaporation et le résidu a été dissout dans 50 ml de chlorure de méthylène, puis on l'a filtré et on a lavé le filtrat avec 50 ml d'une solution à 10% de bisulfate de potassium et 50 ml d'eau. Le séchage a été effectué au-dessus de sulfate de magnésium anhydre, puis on a filtré et on a soumis à l'évaporation. Le résidu a été dissout deux fois dans une quantité minimum de chlorure de méthylène et sa précipitation a été effectuée avec de l'éther. Rendement : 2,8 g (87,2%). Température de fusion 150 à 193°C, $[\alpha]_D^{20} = -60,3^\circ$ (c=1, diméthylformamide). $R_f=0,57$ (A) ; 0,68 (B) ; 0,60 (D).

k) Hydrochlorure de α -benzyloxycarbonyl- ϵ -phénylalanyl-glycyl-prolyl-phénylalanyl-(ω -nitro)arginyl)-lysyl-prolyl-glycine (H 1-9). On a dissout 1,8 g (1,346 mM) de G 1-9 à la température de 0°C dans 20 ml d'un mélange d'acide trifluoro-acétique et de chlorure de méthylène (1:1), on a maintenu cette solution pendant 20 minutes à la température ambiante et on l'a soumise ensuite à évaporation à la température de 0°C. Le résidu a été cristallisé par détrempeage avec 50 ml d'éther sec pour être ensuite dissout dans 10 ml de

diméthylformamide sec ; on y a ajouté 0,33 ml (1,5 mM) d'une solution 4,5N d'acide chlorhydrique anhydre dans du tétrahydrofurane et puis on a effectué la précipitation avec 100 ml d'éther sec. Rendement : 1,55 g (95%). $[\alpha]_D^{20} = -77,8^\circ$. Température de fusion 140 à 192°C. $R_f = 0,73$ (C) ; 0,74 (E).

1) Cyclo- $[\alpha$ -benzyloxycarbonyl- ϵ -phénylalananyl-glycyl-prolyl-phénylalananyl-(ω -nitro)arginyl)lysyl-prolyl-prolyl-glycyle] (I 1-9). On a dissout 1,1 g (0,91 mM) de H 1-9 dans 21 ml de diméthylformamide (on a séché au-dessus d'oxyde de baryum et on distillé au-dessus de "Ninhydride" juste avant l'utilisation), et, tout en agitant dans une atmosphère d'argon sec, à la température de 0°C on a ajouté 1,5 g (1,98 mM) de complexe de dicyclohexylcarbodiimide et de pentafluorophénol (1:3) ("Complexe F") (I, Kovacs et al. *U.Am.Chem.Soc.*, 89,183, 1967). Puis, tout en agitant dans une atmosphère d'argon à la température ambiante pendant 6 heures, on a ajouté une solution de 0,19 ml (1,38 mM) de triéthylamide dans 300 ml de diméthylformamide. Le mélange obtenu a été maintenu à la température ambiante durant 2 jours puis il a été soumis à une évaporation à la température de 28°C.. La cristallisation du résidu huileux a été effectuée par détrempe avec de l'éther sec, puis on l'a filtré et le résidu sur le filtre a été lavé avec de l'éther et puis avec de l'eau. Le produit obtenu a été examiné par chromatographie sur couches minces (plaques "Silufol" UV 254) dans le système B. On a supposé que la matière à $R_f=0,6$ est le cyclopeptide nécessaire (l'un des produits principaux de la cyclisation, chromatiquement mobile, est détecté par examen à la lumière ultraviolette et par un réactif de benzidine). Le mélange de cyclisation a été soumis au préalable au raffinage sur une colonne (2x100 cm) à silicagel (dimension moyenne des particules 20 μ , obtenue par fractionnement du silicagel 5/40 μ de la forme tchécoslovaque "Hemapol"). En se servant du système chloroforme-éthanol-N-butanol-éthylacétate (10:6:4:3) en qualité d'éluant, on a séparé le dicyclohexylcarbamide et un certain nombre de substances peptidiques. Les fractions contenant le cyclopeptide supposé ont été soumises de nouveau au raffinage sur une colonne à

silicagel (3x250 cm, dimension moyenne des particules 20 μ) en se servant du système B en qualité d'éluant, en collectant les fractions en volumes de 20 ml et en enregistrant l'absorption à 280 nm ("Uvicord II"). 55 à 66 fractions ont été
5 soumises à l'évaporation et le résidu a été traité par l'éther. On a obtenu 102 mg (9,73%) de matière cristalline. Température de fusion 163 à 165°C. Chromatographiquement pure (vérifiée par chromatographie sur couches minces sur des plaques "MERK" dans 6 systèmes). $R_f = 0,47$ (B). Masse moléculaire : on a
10 trouvé 1024 (ce qui était déterminé cryoscopiquement en utilisant du carbamide fondu) (A.I.Berlin. "Technique des travaux de laboratoire dans la chimie organique", M.GOSKHIMIZDAT, 1963, 348) ; le calcul a été fait suivant la formule 1163, 313, $[\alpha]_D^{20} = -64,1^\circ$ ($c=0,5$, diméthylformamide). $R_f=0,37$ (A) ;
15 0,43 (B) ; 0,89 (C) ; 0,37 (D) ; 0,96 (E).

m) Cyclo- [(ϵ -phénylalaninyl-glycyl-prolyl-phénylalaninyl-argininyl)lysyl-prolyl-prolyl-glycyl] diacétate (cyclo- [(N $^{\epsilon}$ -1-L-lysine-6-glycine-bradykinine)] , J 1-9. On a dissout 50 mg (0,043 mM) de I 1-9 dans 5 ml d'acide acétique et on a hydro-
20 gène pendant 20 heures en présence de noir de palladium. Ensuite le catalyseur a été filtré et le filtrat a été lyophilisé. Le résidu a été lyophilisé à partir de 10 ml d'eau, puis on a dissout de nouveau dans 10 ml d'eau, on a filtré à travers un filtre à membrane "Synpor" et on lyophilisé de nouveau. On
25 a obtenu une poudre incohérente blanche. Chromatographiquement homogène. $(\alpha)_D^{20} = -76^\circ$ ($c=0,65$, H₂O). Rendement : 45,7 mg (96%). $E_{HIS}=0,65$ (acide acétique 1N). $R_f = 0,69$ (E).

Analyse d'acides-amino : Prolines 2,83 ; glycine 1,90 ; phénylalanine 1,93 ; lysine 1,00 ; arginine 1,23. Par désintégration triptique (T.Deveny, I.Guerguey. "Amino-acides, peptides et protéines", M."Mir", 1976, 168.) de la préparation on n'a obtenu qu'une seule substance ($E_{HIS}=0,82$ acide acétique 1N), ce qui prouve la constitution cyclique du peptide.

Résultats des tests biologiques.

35 Les tests d'abaissement de la pression sanguine chez les rats narcotisés, auxquels a été soumise la cyclo- [(N $^{\epsilon}$ -1-L-lysine, glycine-6)-bradykinine] conforme à l'invention, ont démontré que cet analogue cyclique de la bradykinine (ACB), en comparaison de la bradykinine (BK), se caractérise par son

action nettement prolongée. Concentration minimale de l'ACB : 5 µg/kg (celle de la BK est de 0,5 µg/kg). A la concentration de 50 µg/kg l'ACB a un effet équipresseur par rapport à la BK, mais sensiblement plus prolongé. Dans le cas de l'ACB, l'effet d'abaissement (de 30-40 mm Hg) de la pression sanguine continue pendant 1-2 heures, avec rétablissement subséquent du niveau initial dans une proportion de 40-50% (2-3 heures après le début de l'administration).

Dans des tests in vitro (J.M. Van Rossum. "Arc. int. Pharmacodyn"., 143, 299, 1963) sur l'utérus isolé et l'iléon du rat, il a été établi qu'à des concentrations de 10^{-10} à 10^{-5} M/l l'ACB n'exerce pas l'action myotrope propre à la bradykinine naturelle. A ces concentrations l'ACB n'influe pas sur l'action myotrope de la BK.

L'effet d'augmentation de la perméabilité vasculaire (N. Isokane". The Ochanomizu Med. J." 13, 362, 1965) est au moins sensible pour l'ACB que pour la bradykinine ; les réactions sont comparables quand les concentrations sont de 1 mg/kg et 25 µg/kg respectivement.

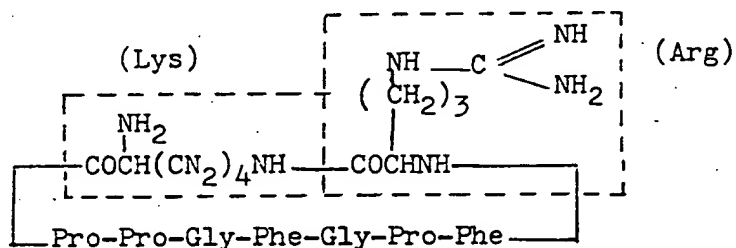
Bien entendu, l'invention n'est nullement limitée aux modes de réalisation décrits qui n'ont été donnés qu'à titre d'exemple. En particulier, elle comprend tous les moyens constituant des équivalents techniques des moyens décrits ainsi que leurs combinaisons, si celles-ci sont exécutées suivant son esprit et mises en œuvre dans le cadre de la revendication qui suit.

R E V E N D I C A T I O N

Analogue cyclique de la bradykinine, caractérisé en ce qu'il s'agit de la cyclo- $[(N^{\epsilon}$ -L-lysine, 6-glycine)-bradykinine], dans laquelle l'azote terminal de l'arginine de la bradykinine est remplacé par la L-lysine, la sérine en position 6 de la bradykinine est remplacée par la glycine, le cycle est fermé par liaison peptidique formée entre le groupe carbonyle de l'arginine et le groupe ϵ -amino de la lysine, ledit analogue cyclique répondant à la formule :

10

15



20

dans laquelle Lys est le résidu de L-lysine, Pro est le résidu de L-proline, Gly est le résidu de glycine, Phe est le résidu de L-phénylalanine, Arg est le résidu de L-arginine.

